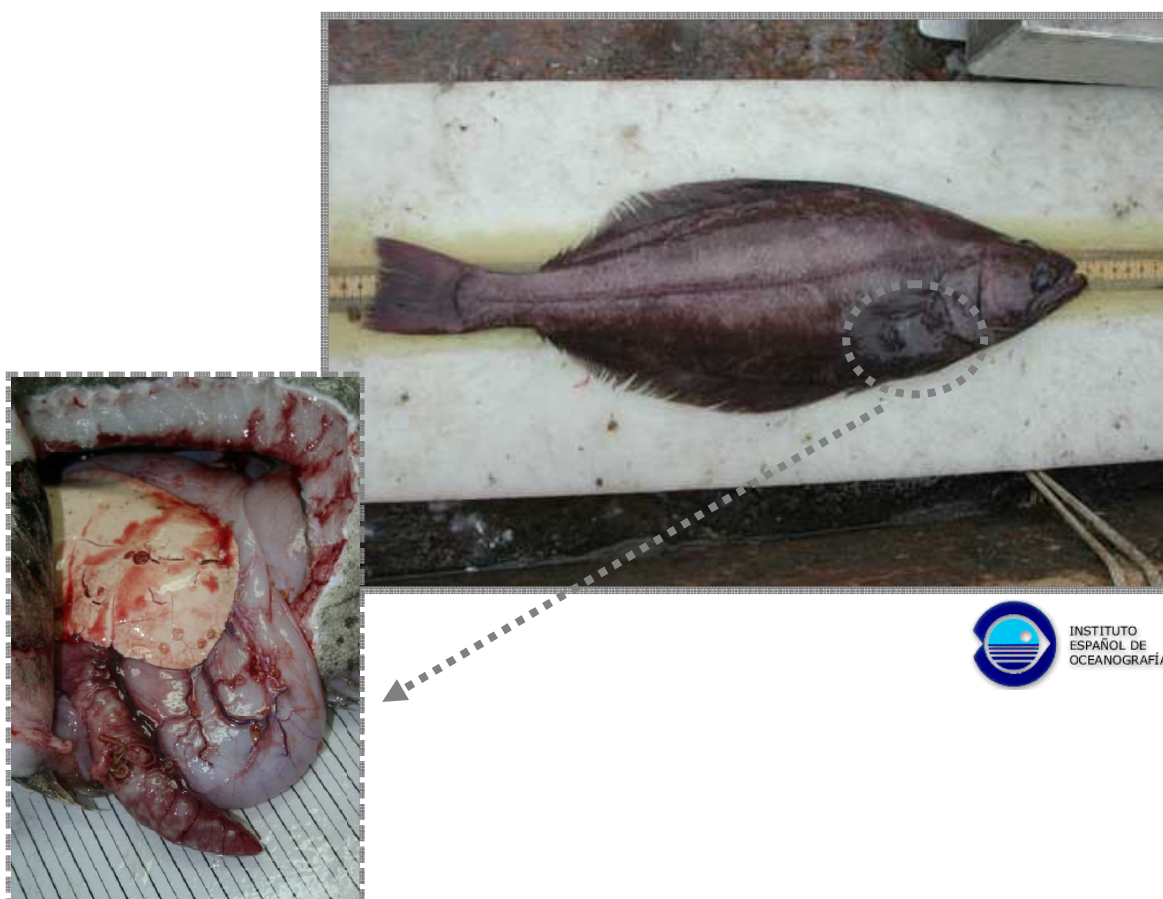


## MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA AVANZADA

### ANISÁKIDOS DE INTERÉS SANITARIO EN VÍSCERAS E IJADAS DE FLETÁN NEGRO (*Reinhardtius hippoglossoides* (Walbaum, 1972) ) EN EL ÁREA DE REGULACIÓN DE LA NAFO, DIV. 3L



Universidad de Vigo  
Facultad de Biología  
Máster en Biotecnología Avanzada

---

**ANISÁKIDOS DE INTERÉS SANITARIO EN VÍSCERAS E IJADAS  
DE FLETÁN NEGRO (*Reinhardtius hippoglossoides* (Walbaum, 1972))  
EN EL ÁREA DE REGULACIÓN DE LA NAFO, DIV. 3L**

Trabajo Fin de Máster, por la Licenciada Estíbaliz Martínez de Lagos Guevara, bajo la tutela del Dr. Raúl Iglesias, del Laboratorio de Parasitología, Facultad de Biología

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	2
Aspectos biológicos básicos de los anisákidos.....	2
Importancia sanitaria y repercusión comercial de los anisákidos.....	6
Medidas de control, prevención y legislación aplicable.....	7
Biología del fletán negro.....	8
INTERÉS Y OBJETIVOS.....	11
MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
Fuente de datos y área de estudio.....	12
Metodología.....	13
RESULTADOS.....	16
DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES.....	28
REFERENCIAS.....	29

# INTRODUCCIÓN

Desde que en 1955 se detectara por primera vez la presencia de un nematodo de la familia Anisakidae en la pared intestinal de un paciente holandés aquejado de fuertes dolores abdominales (Van Thiel *et al.*, 1960), la presencia de las larvas de estos nematodos en vísceras y musculatura del pescado se ha convertido en un grave problema para las industrias del sector, no sólo por su potencial infectivo para el ser humano, generando la enfermedad denominada anisakidosis, que puede condicionar la inocuidad alimentaria de determinados productos pesqueros, sino porque el hallazgo de numerosas larvas en los tejidos del pescado puede resultar desagradable para el consumidor, disminuyendo notablemente la calidad comercial del producto. Durante años, los organismos responsables de garantizar la inocuidad alimentaria en los países industrializados han intentado introducir medidas normativas destinadas a minimizar la presencia de estos parásitos en el pescado y en sus productos derivados, y a proteger la salud del consumidor. A pesar de ello, algunas de estas medidas, que se incluyen explícitamente en las normativas vigentes de ámbito europeo y estatal, no se consideran completamente efectivas a la hora de eliminar el riesgo sanitario potencial asociado al consumo de pescado crudo o inadecuadamente cocinado. En realidad, sólo las medidas que implican un tratamiento térmico adecuado de los productos pesqueros (calentamiento o congelación), junto con una educación responsable de productores y consumidores acerca de los riesgos potenciales asociados a la comercialización y consumo de pescado crudo o semicrudo, pueden garantizar la inocuidad de este tipo de alimentos.

## Aspectos biológicos básicos de los anisákidos

Dentro de la familia Anisakidae, los nematodos pertenecientes a los géneros *Anisakis*, en menor medida *Pseudoterranova*, y de forma casi anecdótica *Contracaecum/Phocascaris*, han sido asociados con casos de parasitación humana (Audicana *et al.*, 2003; Iglesias y Ubeira, 2007; Shamsi y Butcher, 2011). Son gusanos redondos que se desarrollan en el medio marino y que pueden completar su ciclo biológico en mamíferos (cetáceos y pinnípedos) o aves marinas (sólo en el caso de *Contracaecum*).

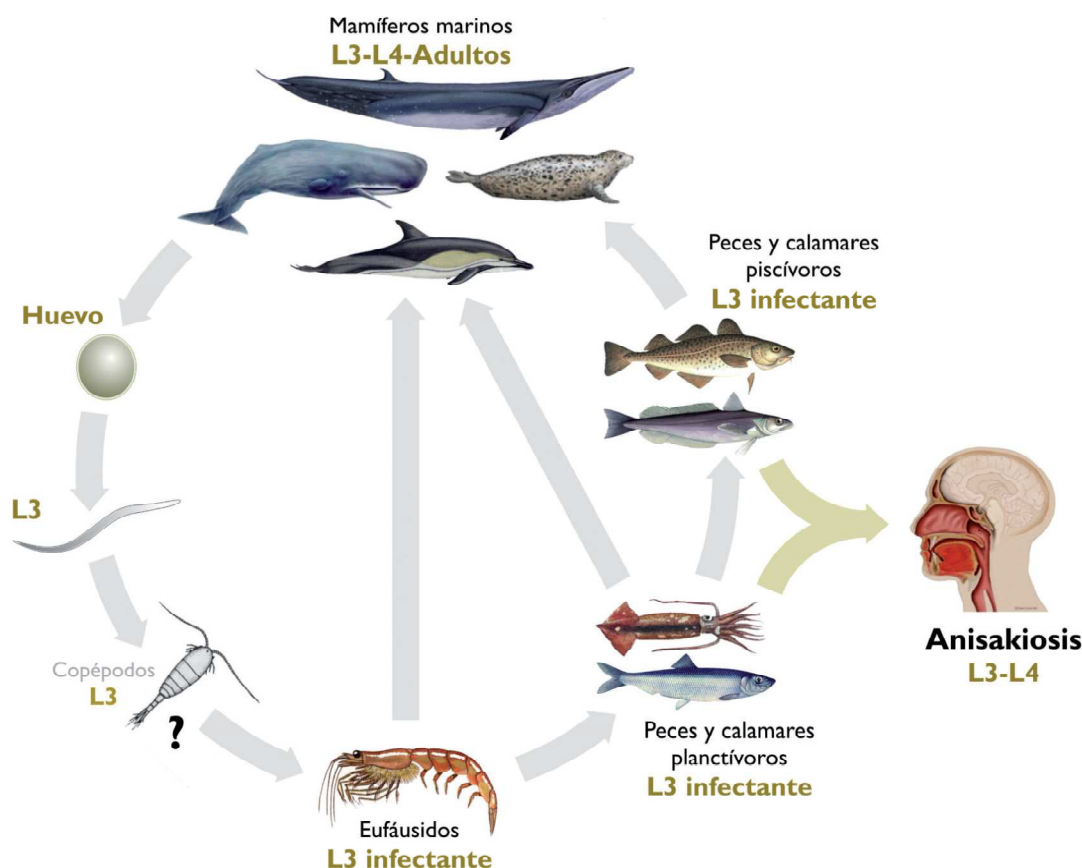
El ser humano, en realidad, es un hospedador accidental que puede resultar infectado cuando ingiere pescado crudo o inadecuadamente cocinado contaminado con el tercer estadio larvario de estos nematodos.

El género *Anisakis* está compuesto por 9 especies, que han sido divididas en dos clados filogenéticamente relacionados, uno de ellos (clado I) compuesto por siete especies, tres de las cuales son especies crípticas que forman el complejo *Anisakis simplex sensu latum* (s.l.), y el otro (clado II), compuesto por otras tres especies (Mattiucci y Nascetti, 2008). Hasta el momento se han confirmado que tres de ellas, *A. simplex sensu stricto* (s.s.) y *A. pregreffii*, pertenecientes al clado I, y *A. physeteris*, del clado II, están implicadas en casos de infección humana, pero no se descarta que todas ellas tengan capacidad para infectar al ser humano (Iglesias y Ubeira, 2007).

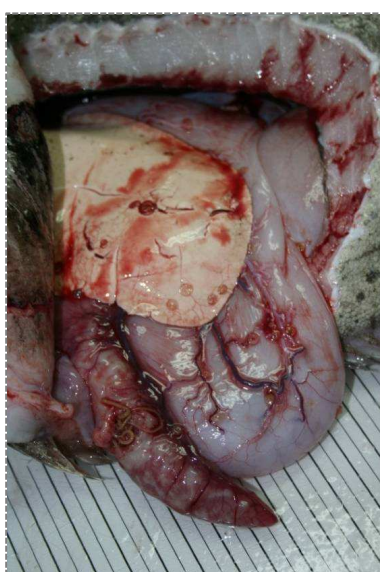
En el género *Anisakis*, los hospedadores definitivos son mamíferos marinos, principalmente cetáceos (Fig. 1). Tras la reproducción los huevos son liberados al medio marino a través de las heces, donde embrionan y eclosionan dando lugar a la larva L3 de vida libre que será ingerida por hospedadores de transporte (copépodos) e intermediarios (eufausiáceos u otros pequeños crustáceos). Estos últimos, son ingeridos por ballenas filtradoras, completándose el ciclo, o por peces y cefalópodos que actúan como hospedadores de transporte de la larva L3. Estos hospedadores son la principal fuente de infección para los cetáceos odontocetos (y pinnípedos) y para el ser humano (Iglesias, 1998).

*Pseudoterranova decipiens* (s.l.) presenta un ciclo de vida muy similar al de *Anisakis* pero los hospedadores finales son exclusivamente pinnípedos (McClelland, 2002). Como hospedadores de transporte e intermediarios también actúan copépodos y pequeños crustáceos bentónicos, que sirven de alimento a los hospedadores paraténicos que son principalmente peces (en este caso no se han encontrado cefalópodos infectados).

Los miembros de los géneros *Contracaecum*/*Phocascaris* presentan como hospedadores definitivos a pinnípedos y como hospedadores intermediarios y paraténicos a pequeños crustáceos y peces. La diferencia entre ambos géneros radica en que también en el caso de *Contracaecum* pueden ser como hospedadores finales las aves marinas (Køie y Fagerholm, 1995; Mattiucci *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Ciclo biológico general de *Anisakis*. En letra verde se resaltan las diferentes fases de desarrollo del parásito (L3: tercer estadio larvario; L4: cuarto estadio larvario).

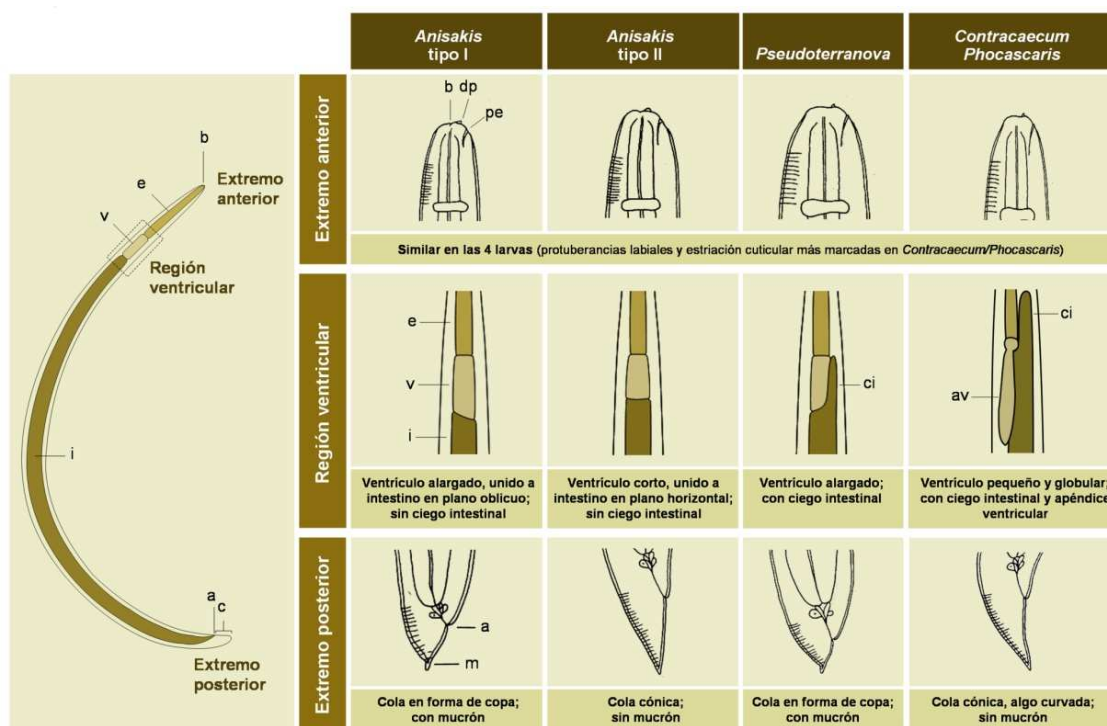


**Figura 2.** Presencia de anisákidos en el paquete visceral de un fletán negro.

Aunque en conjunto los anisákidos presentan muy baja especificidad de hospedador y pueden encontrarse en numerosas especies de peces y calamares, desde el punto de la seguridad alimentaria hay que prestar especial atención a las especies de peces de interés comercial, por presentar mayor riesgo para la salud humana si son ingeridas crudas o poco cocinadas. En los peces, las larvas L3 de *Anisakis* y *Pseudoterranova* se encuentran en la cavidad abdominal, enquistadas en forma de espiral plana sobre los órganos (principalmente hígado; Fig. 2) y en mesenterios.

En algunas especies de peces, bien de forma natural o durante el almacenamiento postcaptura, las larvas pueden migrar a la musculatura circundante. La musculatura hipoaxial perivisceral (ventrescas o ijadas), por tanto, es la zona que habitualmente está más parasitada, si bien en algunas especies pueden aparecer también algunas larvas en lomos y cola (Karl *et al.*, 2011). En el caso de *Contracaecum/Phocascaris*, las larvas suelen aparecer estiradas, principalmente en los mesenterios.

La identificación de cada tipo larvario se basa en el examen microscópico de tres zonas principales del nematodo: la región cefálica o anterior, la región ventricular y la región posterior (Fig. 3). Sin embargo, debido a la existencia de numerosas especies crípticas y a la ausencia de estructuras sexuales desarrolladas, la identificación de las larvas L3 a nivel de especie sólo puede confirmarse empleando técnicas moleculares (Mattiucci y Nascetti, 2008).



**Figura 3.** Resumen de la morfología básica de una L3 de anisákidos, (izquierda), y de los principales caracteres taxonómicos que permiten diferenciar los distintos tipos de larvas que han sido asociadas a casos de infección humana (b: boca; dp: diente de penetración; e: esófago; v: ventrículo; i: intestino; ci: ciego intestinal; av: apéndice ventricular; a: ano; m: mucrón)



organoléptico y en la presencia antiestética para el consumidor repercutiendo en su precio, sino que pueden suponer un riesgo para la salud si estos parásitos son capaces de infectar al ser humano en caso de que el producto en cuestión sea consumido crudo o semicrudo.

Una vez ingeridos, los anisákidos pueden producir, dependiendo del lugar donde se asiente la larva, síntomas digestivos de diferente severidad (dolor abdominal tipo úlcera o peritonitis, náuseas y vómitos), que pueden ir acompañados, si el paciente ha sido sensibilizado tras un contacto previo con el parásito, de manifestaciones alérgicas como urticaria, angioedema, o incluso, choque anafiláctico, lo que pondría en peligro la vida del paciente. En algunas personas, puede aparecer sólo el cuadro alérgico sin ser patentes las manifestaciones digestivas (Daschner *et al.*, 2012). En conjunto, los cuadros clínicos provocados por larvas de anisákidos se conocen con el nombre de anisakidosis y, dependiendo del género implicado anisakiosis (*Anisakis*), pseudoterranovosis (*Pseudoterranova*) o contracecosis (*Contracaecum*).

Los casos de anisakiosis se han descrito desde 1960, diagnosticándose más de 30.000 casos en todo el mundo (Iglesias y Ubeira, 2007), concentrándose sobre todo en Japón, donde el consumo de pescado crudo en forma de sushi o sashimi forma parte de la gastronomía del país. Otros tipos de preparaciones culinarias como el arenque marinado o ligeramente salado, el cebiche sudamericano, o los boquerones en vinagre típicos de nuestra gastronomía han sido asociados con casos de anisakiosis, y suponen un riesgo si el pescado no es congelado con anterioridad para asegurar la muerte de la larva. Para que las larvas no supongan un riesgo para la salud es necesario someterlas a un tratamiento térmico efectivo (congelación o cocinado). Marinados, ahumados en frío, o cualquier otro tipo de preparación, que no suponga congelar o calentar adecuadamente el pescado puede suponer un riesgo su consumo.

En relación con la alergia atribuida a la ingestión de las larvas de *Anisakis* es importante subrayar que, aunque existe todavía cierta controversia sobre el tema, la ausencia de reacciones alérgicas observada en personas sensibilizadas que fueron sometidas a estudios de provocación oral con larvas muertas o con extractos de las mismas, o que durante años han seguido una dieta basada en el consumo de pescado bien cocinado o sometido a congelación previa, sugiere que, en ausencia de alteraciones de la mucosa digestiva, esta entidad clínica no se comporta como otras alergias alimentarias en las que la simple ingestión de los alérgenos es suficiente para desencadenar la sintomatología. En



este sentido, empieza a haber consenso en relación con la hipótesis de Daschner *et al.* (2012) según la cual sólo las larvas vivas serían capaces de producir alérgenos funcionales y de inocularlos en la submucosa, donde se concentran los vasos sanguíneos y los mastocitos sensibilizados que participan en el desarrollo de las manifestaciones alérgicas. A la vista de esta hipótesis y con las evidencias existentes actualmente es necesario entender que con la congelación o el cocinado del pescado se elimina totalmente el riesgo que conlleva la presencia de estos parásitos en productos pesqueros.

### **Medidas de control, prevención y legislación aplicable**

Para el control de la anisakidosis en los productos pesqueros existen diferentes medidas. A continuación se resumen las que, de alguna manera, se recogen en la legislación nacional (Real Decreto 1420/2006) y comunitaria (Reglamentos (CE) 853/2004 y 2074/2005, y (UE) 1276/2011).

- 1- Selección del pescado: empleando aquel que por su naturaleza, procedencia o talla se considera que está menos parasitado. Esta medida es sólo eficiente cuando se trata de especies de acuicultura cuyo cultivo y alimentación impiden la infección del pez.
- 2- Evisceración postcaptura: medida que elimina la presencia de parásitos en la cavidad abdominal y que, en algunas especies, puede minimizar las migraciones que efectúan algunas larvas desde la cavidad a la musculatura tras la captura, pero que no elimina el riesgo de transmisión en especies donde la parasitación muscular “natural” es frecuente.
- 3- Inspección visual normal: permite detectar las larvas visualmente y su extracción manual, retirando del mercado los productos con un alto nivel de parasitación. Sólo permite detectar las larvas musculares que están embebidas en las capas más superficiales.
- 4- Inspección visual al trasluz o a contraluz (*candling*): permite visualizar los filetes sobre una fuente de luz fría y extraer manualmente las larvas encontradas.

Al igual que en la medida anterior, los productos con alto nivel de parasitación se retiran del mercado. De nuevo minimiza el riesgo pero no lo elimina por completo, siendo solo aplicable a filetes de pescado blanco, sin piel y con un grosor inferior a 3 cm. Se considera que un 25% o más de las larvas no son detectadas. Hay que añadir que además de lento es costoso.

5- Tratamiento térmico: implica someter el pescado a temperaturas iguales o superiores a 60 °C o iguales o inferiores a -20 °C durante el tiempo suficiente para asegurar la muerte de las larvas. Elimina el riesgo de transmisión, siendo una medida fácilmente aplicable a escala industrial y doméstica. La legislación actual recomienda utilizar cualquiera de los métodos de congelación que se citan a continuación:

**-20 °C en todo el producto 24 h o más**

**-35 °C en todo el producto 15 h o más**

6- Educación pública: una concienciación sobre las medidas a tomar en función de cómo se vaya a consumir el pescado y que permita su consumo sin riesgos es fundamental para el control de la anisakidosis, además de resultar una medida económica.

### **Biología del fletán negro**

El fletán negro (*Reinhardtius hippoglossoides* (Walbaum, 1792)) pertenece a la familia Pleuronectidae dentro del orden Pleuronectiformes o peces planos. Distinguido de otros Pleuronectiformes por su color oscuro en la cara ventral, su ojo izquierdo en el margen dorsal y la línea lateral recta (Scott y Scott, 1988).

Su distribución geográfica es circunglobal en el Hemisferio Norte (Figura 4); en el Pacífico Norte, en el Mar de Japón desde el norte de Honshu hasta el Shishmaref en Alaska, en el Mar de Chukchi, en las Islas Aleutianas, y en el sureste hasta el norte de Baja California, México. En el Atlántico Norte se distribuye desde New Jersey (USA) hasta Spitsbergen (Islas Svalbard) y al sur del Mar Barents, océano Ártico, hasta Irlanda (Scott y Scott, 1988; Yang y Livingston, 1988; Chipertzak *et al.*, 1995; Akira, 2004; Moukhametov *et al.*, 2008).



**Figura 4.** Distribución geográfica del fletán negro (*Reinhardtius hippoglossoides*)

La principal localización del área de puesta en el Atlántico Noroeste se ubica principalmente en el área del Estrecho de Davis (67°N) al final del invierno, principios de primavera (Bowering and Chumakov, 1989), y en el Noreste la puesta ocurre más sincronizada en el tiempo: el pico tiene lugar siempre en el último trimestre del año, dándose a lo largo de la plataforma continental entre el norte de Noruega y el archipiélago de Svalbard (Albert *et al.*, 1998). Las mayores concentraciones de juveniles se encuentran: en el Atlántico Noreste, en el área al norte de Spitsbergen o Svalbard y en el mar de Barents (Godo y Haug, 1989) y en el Atlántico Noroeste, en el oeste de Disko Bay (69°N).

Se trata de una especie pleuronectiforme euritópica, con una amplia distribución batimétrica, desde 20 m hasta más de 1200 metros y en temperaturas entre -1 y 10 °C, siendo más abundantes entre -0.5 y 3 °C. A ambos lados del Atlántico Norte las capturas medias de fletan negro generalmente aumentan con la profundidad hasta un límite y luego declinan, observándose una clara tendencia de incremento de la talla con la profundidad en el Atlántico Noroeste pero no en el Noreste (Bowering y Nedreaas, 2000).

El fletán negro, también conocido como halibut de Groenlandia (*Reinhardtius hippoglossoides*) es una especie de alto valor comercial y uno de las principales objetivos pesqueros de la flota que faena en el área NAFO, relativamente más abundante en la Div. 3L (zona norte del Gran Banco) y donde la flota realiza un gran esfuerzo.

La pesquería en el Atlántico Norte comenzó en los años 70, dándose a conocer en España a mediados de los 80 y aumentando su importancia a nivel mundial hasta nuestros días. Su comercialización varía en función del país del que se trate. Para países como España, se trata de una pesquería de gran altura donde el pescado es ultracongelado en alta mar, por lo tanto resulta ser un producto pesquero de riesgo de transmisión nulo de cara a su comercialización y posterior consumo. Pero países, sobre todo del norte, como pueden ser Groenlandia o Canadá presentan un comercio en fresco debido a la cercanía del caladero. Otros países como Dinamarca comercializan esta especie como ahumado en frío, proceso que va muy bien debido a que se trata de una especie con una carne de elevado contenido graso.

La talla de captura varía en función de las propias capturas del barco. Es decir, una vez establecida la cuota para cada país y para cada barco, éstos pescarán los tamaños que se consideren productivos, es decir, aquellos que tengan valor en el mercado. De esta manera no se puede hablar de talla mínima legal como puede haber para otras especies, como pueden ser la sardina o el jurel. La regulación para esta pesquería indica que si en un lance un determinado porcentaje está representado por una alta proporción de tamaños juveniles, serían capturas accidentales, y el barco debe alejarse una serie de millas para volver a pescar.

La captura a bordo presenta gran variedad de tallas, de forma que podrán encontrarse en el mercado tanto piezas de 30 cm como piezas de 80 cm, comercializadas con diferentes procesados y presentación. Las piezas pequeñas suelen presentarse evisceradas, sin cabeza, sin cola, con y sin piel, y las de mayor tamaño se presentan fileteadas.

## INTERÉS Y OBJETIVOS

De acuerdo con un informe reciente publicado por la European Food Safety Authority (EFSA), uno de los aspectos que deben ser sustancialmente mejorados en lo que se refiere a la evaluación y gestión de riesgos parasitarios asociados al consumo de productos de la pesca es la investigación relativa a la distribución geográfica y estacional de los distintos parásitos que se consideran potencialmente patógenos para el ser humano, así como el estudio de su localización anatómica en las distintas especies piscícolas de interés comercial (EFSA Panel on BIOHAZ, 2010).

Desde esta perspectiva, los estudios realizados hasta la fecha sobre la presencia de anisákidos de interés sanitario en el fletán negro son muy escasos, relativamente antiguos, y en su mayoría, orientados a conocer la posible utilidad de éstos y otros parásitos como bioindicadores de los diferentes *stocks* poblacionales de esta especie (Arthur y Albert, 1993; Arthur y Albert, 1994; Boje *et al.*, 1997). Hasta la fecha, por tanto, no existen trabajos que hayan analizado en detalle la parasitación muscular de este pleuronéctido por estos nematodos, ni su evolución a lo largo de la vida del hospedador. Este aspecto es especialmente importante para el sector alimentario que se dedica a la elaboración y/o comercialización de fletán negro fresco o ahumado en frío, donde la presencia de larvas de nematodos anisákidos debe ser considerada un riesgo biológico potencial y, como tal, debe ser objeto de control. Por todo ello, en el presente trabajo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

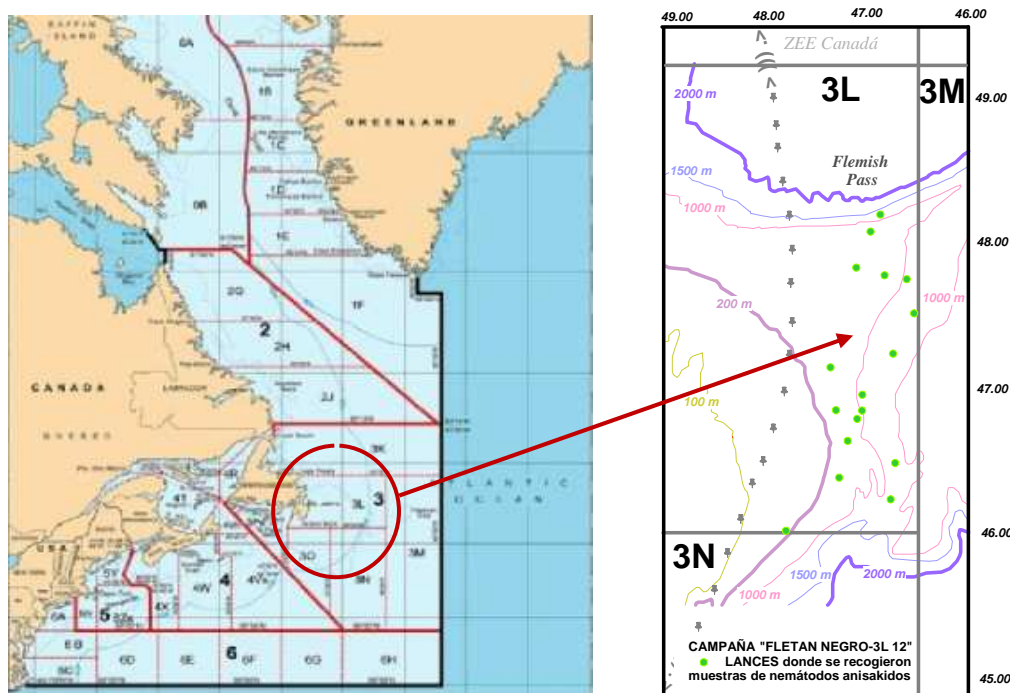
- 1. Analizar el estado actual de la parasitación por anisákidos potencialmente zoonóticos en el fletán negro (*Reinhardtius hippoglossoides*) en el área de regulación de NAFO, Div. 3L.**
- 2. Determinar el grado de parasitación muscular “natural” exhibido por esta especie.**
- 3. Investigar la relación entre la parasitación por los distintos anisákidos y la talla del hospedador.**

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Fuente de datos y área de estudio

Los datos de captura y ecológicos utilizados en el presente estudio fueron obtenidos en la campaña científica de arrastre de fondo “*Fletán Negro 3L-12*”, también denominada en el ámbito de NAFO como Campaña EU-España en el Área de Regulación de la NAFO en las Divs. 3LNO, que se realiza en aguas internacionales del Atlántico noroeste (Figura 5). El diseño de la campaña sigue el método del área barrida, con un muestreo aleatorio estratificado por estratos de profundidad (Román *et al.*, 2012). Esta campaña forma parte de una serie iniciada en 2003, cuya realización está a cargo del Equipo de Pesquerías Lejanas del Centro Oceanográfico de Vigo del Instituto Español de Oceanografía (IEO, Ministerio de Economía y Competitividad). Está financiada por la administración española y también por la UE a través del Programa Nacional de Recolección y Gestión de Datos Necesarios para el Funcionamiento de la Política Pesquera Común.

La campaña se llevo a cabo en el mes de agosto a bordo del B/O *Vizconde de Eza* (propiedad de la Secretaría General del Mar - Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente) y se realizaron 105 pescas (98 válidas y 7 nulas) en un rango de profundidad de 112 a 1 478 metros.



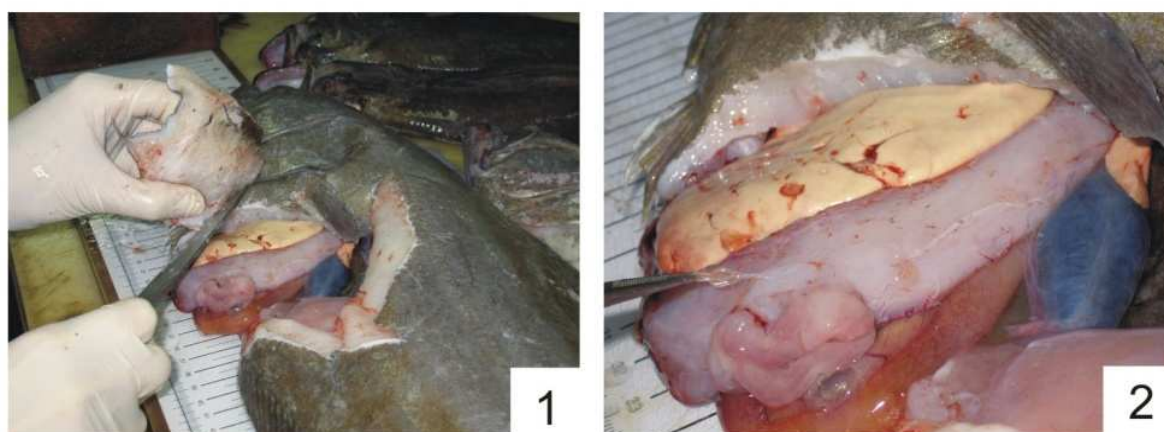
**Figura 5.** Mapa del área de la Convención NAFO (A) y zona donde se desarrolló la campaña “*Fletán Negro 3L-12*” (B) con la localización de los puntos de muestreo.

## Metodología

Durante la campaña se recogieron 150 muestras de fletán negro en un rango de profundidad de 207 y 1234 m de profundidad (Figura 5).

Inmediatamente tras la captura, cada ejemplar fue medido y pesado. Los ejemplares analizados presentaron una longitud comprendida entre los 14 cm y los 69 cm, mostrando una talla media de 41 cm, y un rango de pesos comprendido entre los 70 g y los 3530 g, con un peso medio de 685 g.

El examen parasitológico fue abordado en 2 etapas. La primera, que se llevó a cabo íntegramente a bordo, en donde se realizó la resección y congelación de las ijadas de cada paquete visceral y también la membrana peritoneal de las mismas (Figura 6). Este proceso fue efectuado una vez los ejemplares estuvieron a bordo para prevenir la existencia de posibles migraciones *postmortem*, ya que en determinadas especies de peces las larvas *Anisakis* presentes en la cavidad pueden invadir la musculatura perivisceral durante el almacenamiento postcaptura (Karl *et al.*, 2011). De esta manera, se pudo valorar con precisión la parasitación muscular “natural” existente en los peces examinados. Durante la segunda etapa del estudio, realizada ya en el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Biología, se llevó a cabo el recuento e identificación de las larvas recolectadas a bordo, además del estudio parasitológico completo de los nematodos presentes en la musculatura de las ijadas.



**Figura 6.** Recogida de las muestras. (1) Corte de la ijada. (2) Extracción de los parásitos de la cavidad abdominal.



Durante la primera etapa, las larvas fueron recogidas de la superficie de la membrana peritoneal de las ijadas y del paquete visceral de cada ejemplar con ayuda de agujas de disección o pinzas, y colocadas en un frasco con suero salino para permitir su desencapsulación y limpieza. Seguidamente se fijaron en fluido de Berland (95% de ácido acético glacial y 5% de formalina) y finalmente se almacenaron en etanol 70%. Ya en el laboratorio, las ijadas fueron descongeladas, liberadas de su piel y membrana peritoneal, comprimidas entre dos placas de metacrilato para reducir su grosor, y examinadas por ambos lados a contraluz (*candling*) empleando un estereomicroscopio con luz diascópica. Las ventrescas más gruesas se filetearon (*slicing*) en filetes más finos antes de ser sometidas al mismo procedimiento de detección. Las larvas encontradas embebidas en la musculatura fueron extraídas con ayuda de una aguja y fijadas y almacenadas como el resto. Todos los nematodos procedentes de ambas localizaciones (cavidad visceral e ijadas) fueron contados, transparentados con glicerol y examinados al microscopio para su identificación. Dado que no se emplearon técnicas moleculares, los anisákidos no se pudieron identificar a nivel de especie. A pesar de ello, los especímenes del género *Pseudoterranova* fueron asignados al complejo multiespecífico *P. decipiens* (s. l.) en base a los diversos estudios moleculares que demuestran que las larvas de este género que parasitan hospedadores del Atlántico norte pertenecen a este complejo (Mattiucci y Nascetti, 2008). Por el contrario, los miembros pertenecientes a la subfamilia Contracaecinae fueron considerados como *Contracaecum/Phocascaris* ante la imposibilidad para distinguir morfológicamente las larvas L3 de ambos géneros (Berland, 2006). Finalmente, las estructuras taxonómicas propias de los diferentes tipos larvarios detectados se fotografiaron con ayuda de una cámara digital Olympus SC30 acoplada a un microscopio Olympus BX41.

Para describir la parasitación detectada se emplearon los siguientes índices ecoparasitológicos, de acuerdo con Bush *et al.* (1997):

**Prevalencia (P):** proporción de hospedadores infectados por una determinada especie parásita existente entre la población de hospedadores estudiada.

$$P(\%) = (n^{\circ} \text{hospedadores parasitados} / n^{\circ} \text{hospedadores examinados}) \times 100$$

**Intensidad media ( $I_M$ ):** número medio de individuos de una especie parásita presente en los hospedadores que están infectados por dicha especie.

$$I_M = n^\circ \text{ de individuos de una especie parásita} / n^\circ \text{ de hospedadores parasitados}$$

**Abundancia media ( $A_M$ ):** número medio de individuos de una especie parásita presente en la población de hospedadores examinados. A diferencia de la intensidad, este parámetro considera tanto los hospedadores infectados como los no infectados.

$$A_M = n^\circ \text{ de individuos de una especie parásita} / n^\circ \text{ de hospedadores examinados}$$

Con el fin de evaluar la relación entre la longitud del hospedador y el grado de parasitación (prevalencia y abundancia) los individuos de fletán negro analizados fueron agrupados en 5 clases de talla: clase 1 (14-25 cm; n=10), clase 2 (26-35 cm; n= 38), clase 3 (36-45 cm; n=44), clase 4 (46-55 cm; n=46), y clase 5 (56-69 cm; n= 12). La correlación entre la longitud del pez y la abundancia de los distintos tipos larvarios fue analizada también mediante el Coeficiente de correlación por rangos de Spearman ( $r_s$ ) empleando el programa GraphPad InStat v. 3.06 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EEUU). Se eligió esta prueba no paramétrica porque los valores de abundancia parasitaria registrados no se ajustaron a una distribución normal.

## RESULTADOS

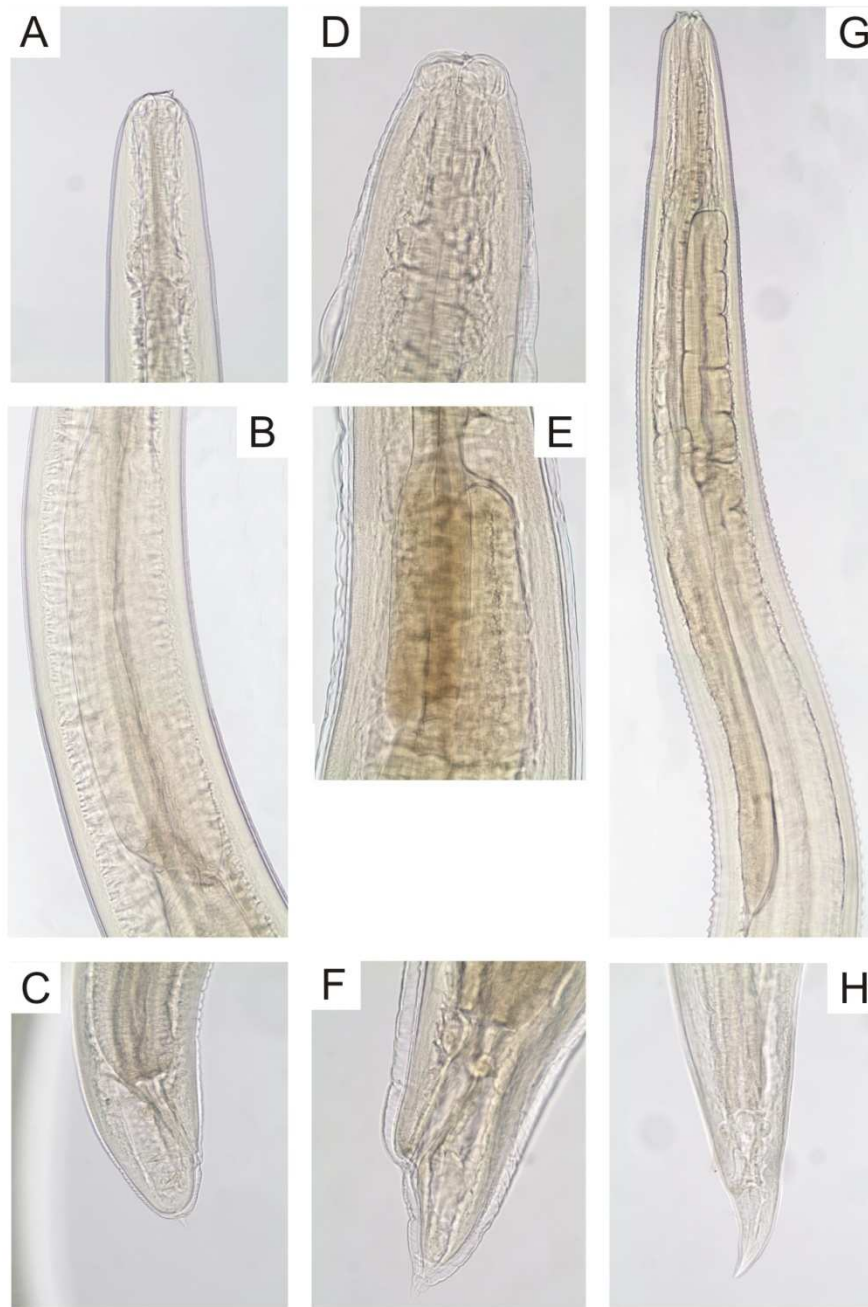
El 89,3% (134 individuos de 150 totales) de los fletanes muestreados presentaron parasitación por algún anisákido potencialmente infectivo para el ser humano. La prevalencia global (visceral+muscular) de larvas de *Anisakis* tipo I resultó ser del 82,7% seguida de *Contracaecum/Phocascaris* que presentó una prevalencia del 58,6% (Tabla 1). Es importante atender a la intensidad de parasitación, que en el caso de *Anisakis* tipo I, llegó a ser de 116 larvas por individuo, mientras que en el caso de *Contracaecum/Phocascaris* se encontró un máximo de 44 larvas por ejemplar. *Pseudoterranova decipiens* resultó ser la especie que presentó menos prevalencia, con un rango de intensidades de apenas 1-5 parásitos presentes en un hospedador (Tabla 1).

	Prevalencia (%)	Intensidad media	Rango de intensidades	Abundancia media
<i>Anisakis</i> tipo I (global)	82,7	13,2	1-116	10,9
Paquete visceral	70	9,8	1-106	6,8
Ijadas	71,3	5,7	1-44	4,1
<i>Pseudoterranova decipiens</i> (s.l.). <sup>1</sup>	6,6	1,7	1-5	0,1
<i>Contracaecum/Phocascaris</i> <sup>1</sup>	58,6	4,9	1-44	2,9

<sup>1</sup> Solo se detectó parasitación en el paquete visceral.

**Tabla 1.** Índices ecoparasitológicos observados para los diferentes tipos larvarios de anisákidos detectados en *R. hippoglossoides*.

Del total de larvas de anisákidos detectados, el 70,5% se encontraron en la cavidad corporal, mientras que el 29.5% restante, representado únicamente por larvas de *Anisakis* tipo I, se detectó en ijadas. Para este tipo larvario la prevalencia en el paquete visceral fue de un 70%, y un 71,3% en las ventrescas, observándose una intensidad media de un 9,8 en la cavidad corporal y un 5,7 en ijadas, con intensidades máximas de 106 y 44 larvas, respectivamente. En 19 de los 124 individuos infectados (15,3%) por larvas de *Anisakis* tipo I sólo se detectó parasitación muscular. En la Figura 7 se muestran las principales características morfológicas de los 3 tipos larvarios detectados en el estudio.



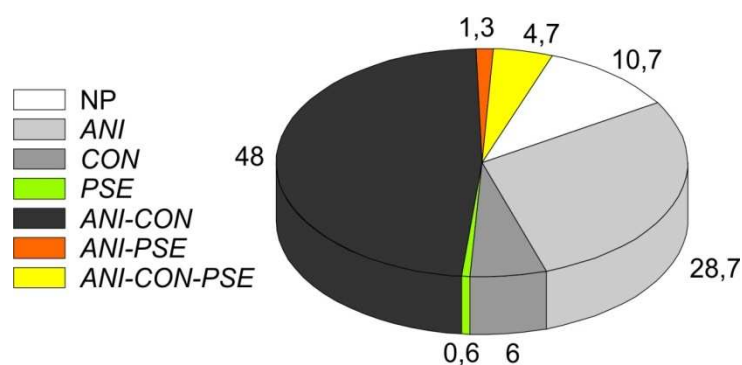
**Figura 7.** Apariencia morfológica de los diferentes tipos larvarios de anisákidos detectados en *R. hippoglossoides*. **A, B, C.** Extremo anterior, región ventricular y extremo posterior de *Anisakis* tipo I, respectivamente. **D, E, F.** Extremo anterior, región ventricular y extremo posterior de *P. decipiens* (s.l.), respectivamente. **G, H.** Parte anterior con región ventricular y extremo posterior de *Contracaecum/Phocascaris*, respectivamente.

En la Figura 8 están representadas las frecuencias de las infecciones mixtas detectadas en el muestreo. Casi la mitad de los individuos analizados (48%) presentaron infección mixta por *Anisakis* tipo I-*Contracaecum/Phocascaris*, y solo el 4,7% de los individuos resultaron infectados por las tres especies.

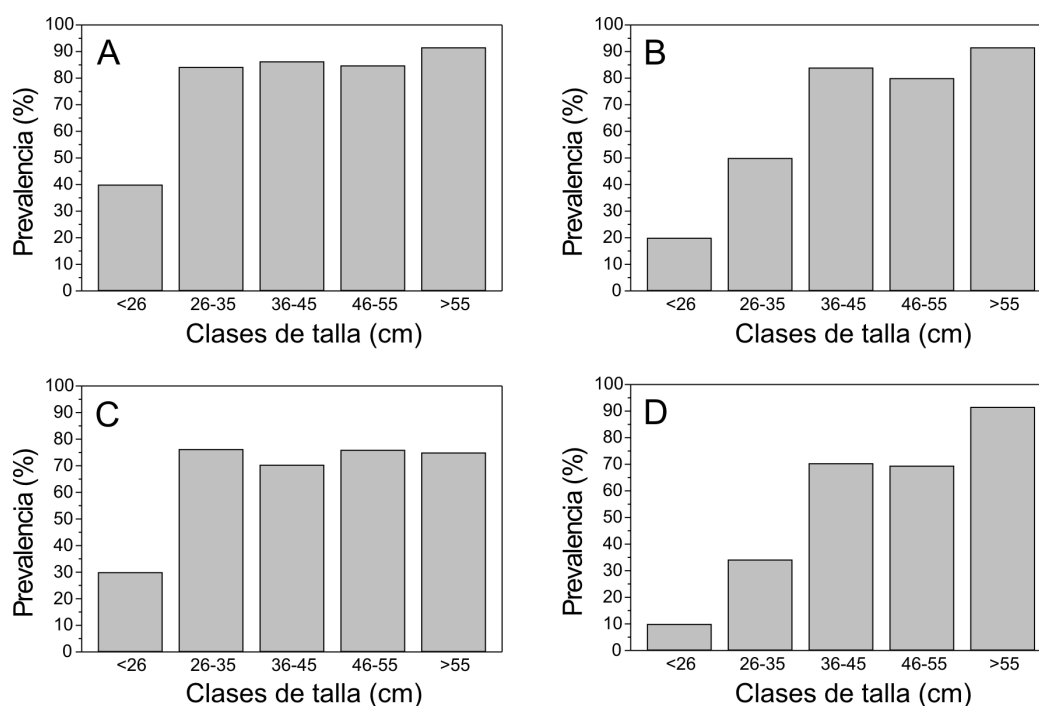
La prevalencia de parasitación global (Fig. 9A) y muscular (Fig. 9C) por larvas de *Anisakis* se vio duplicada de la primera a la segunda clase de talla analizada, manteniéndose más o menos constante a partir de esta última. En el caso de la parasitación visceral, sin embargo, se observó una tendencia general de incremento progresivo de la prevalencia en las 3 primeras clases de talla (Fig. 9B), como se comprobó en el caso de *Contracaecum/Phocascaris* (Fig. 9D).

Tanto a nivel global como a nivel visceral, se observó una correlación positiva significativa entre la talla del fletán negro y la abundancia de larvas de *Anisakis* tipo I (Figs. 10A y 10B, respectivamente). Aunque la correlación observada a nivel muscular también fue estadísticamente significativa (Fig. 10C), el grado de asociación entre ambas variables (talla y abundancia) fue sensiblemente inferior ( $r_s=0.2991$ ) al observado en el caso de la parasitación visceral y global, ésta última claramente ocasionada por la primera. De hecho, cuando se analizó la evolución de la abundancia media en las distintas clases de talla analizadas se comprobó un incremento progresivo de este parámetro tanto a nivel global y visceral (Figs. 11A y 11B), pero no a nivel muscular (Fig. 11C), observándose en este caso un claro cambio de tendencia a partir de los 46 cm de longitud. Además, si atendemos a la proporción de larvas presentes en la cavidad visceral y en la musculatura observamos que a medida que aumenta la talla del hospedador se produce una inversión en la proporción de larvas encontradas en ambas localizaciones (Fig. 12).

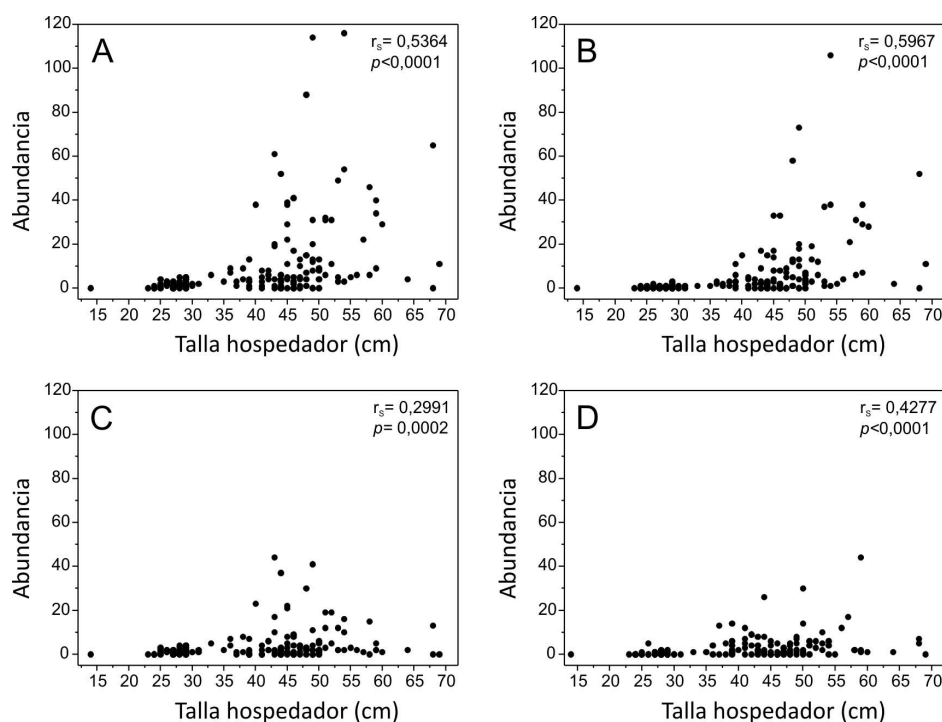
En el caso de *Contracaecum/Phocascaris*, cuya presencia se restringió a la cavidad corporal, el comportamiento de la parasitación respecto a la talla del hospedador fue muy similar al observado en el caso de la parasitación visceral por *Anisakis* (Figs. 10D y 11D). A nivel global, la tendencia al incremento exhibida por ambos tipos de larvas explica el aumento progresivo en la frecuencia de multiparasitación observado en las cinco clase de talla examinadas (Fig. 13).



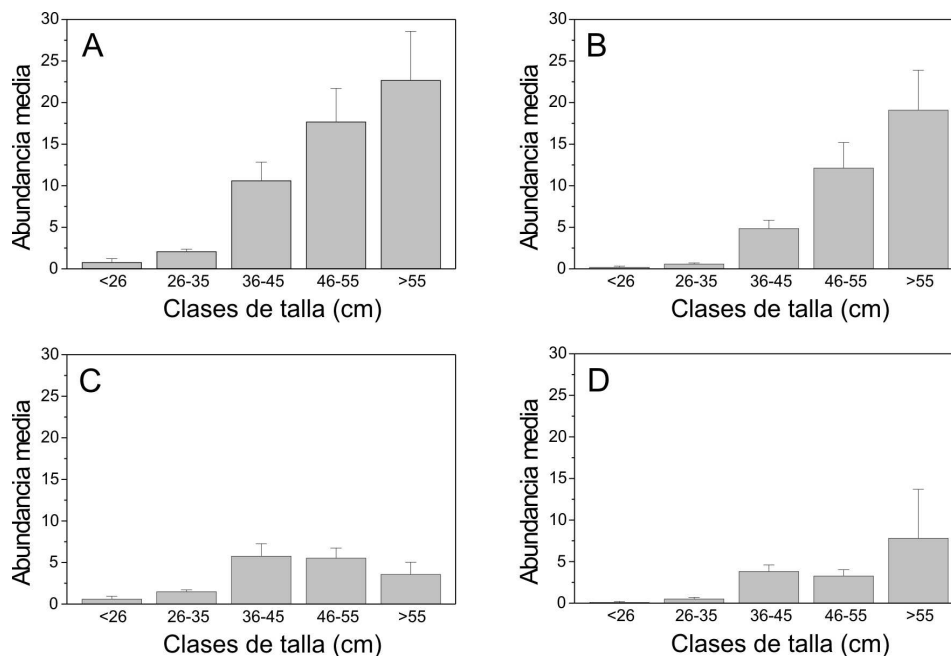
**Figura 8.** Porcentaje global de hospedadores no infectados (NP) y parasitados por 1 (ANI: *Anisakis*; CON: *Contracaecum/Phocascaris*; PSE: *Pseudoterranova decipiens s. l.*), 2 (ANI-CON y ANI-PSE) y 3 tipos larvarios (ANI-CON-PSE).



**Figura 9.** Prevalencia de anisákidos en las distintas clases de talla de *R. hippoglossoides*. **A, B, C.** Prevalencia global (visceral + muscular), visceral y muscular de *Anisakis* tipo I, respectivamente. **D.** Prevalencia global (visceral) de *Contracaecum/Phocascaris*.

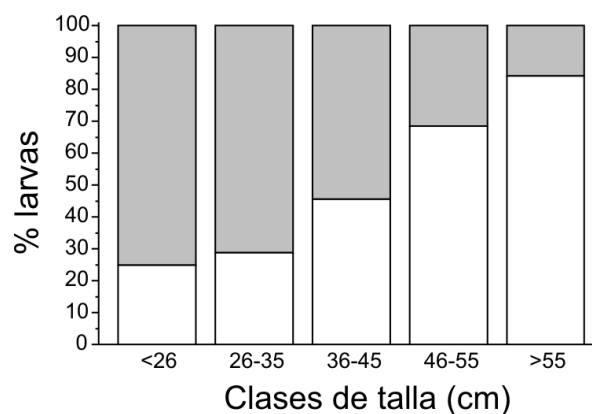


**Figura 10.** Correlación entre la abundancia de parasitación por anisákidos y la talla de *R. hippoglossoides* ( $r_s$ : coeficiente de correlación de Spearman;  $p$ : probabilidad estadística). **A, B, C.** Correlación a nivel global (visceral + muscular), visceral y muscular de *Anisakis* tipo I, respectivamente. **D.** Correlación de *Contracaecum/Phocascaris*.

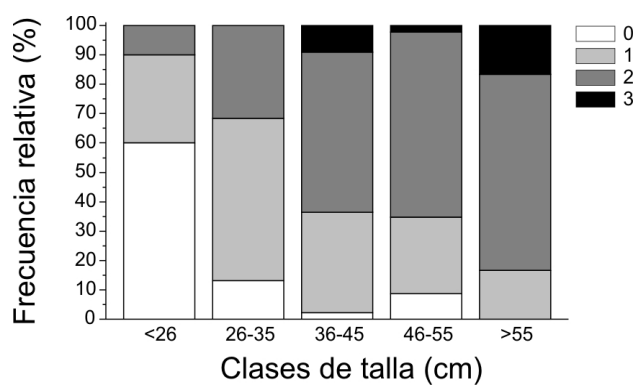


**Figura 11.** Abundancia media de anisákidos en las distintas clases de talla de *R. hippoglossoides*. **A, B, C.** Abundancia media de *Anisakis* tipo I a nivel global (visceral + muscular), visceral y muscular, respectivamente. **D.** Abundancia media global (visceral) de *Contracaecum/Phocascaris*.





**Figura 12.** Proporción de larvas de *Anisakis* viscerales (blanco) y musculares (gris) en las distintas clases de talla de *R. hippoglossoides*.



**Figura 13.** Frecuencia relativa de hospedadores no parasitados e infectados por 1, 2 y 3 especies simultáneamente en las distintas clases de talla de *R. hippoglossoides*.

## DISCUSION

Los resultados obtenidos en este trabajo revelan que los ejemplares de *R. hippoglossoides* capturados en la Div. 3L de NAFO están abundantemente parasitados por larvas del clado I del género *Anisakis*. Aunque en este estudio no hemos podido confirmar la identidad exacta de estos nematodos, los estudios moleculares realizados hasta el momento con larvas similares obtenidas de diferentes hospedadores procedentes de la costa este canadiense revelan que la única especie del género que parece estar presente en estas aguas es *A. simplex* (s.s.) (Mattiucci y Nascetti, 2008). Por tanto, es muy probable que las larvas detectadas en este estudio pertenezcan a esta genoespecie, que completa su ciclo biológico en cetáceos. En cuanto a los especímenes del complejo *P. decipiens* encontrados en este pleuronéctido, podrían ser de la genoespecie *P. bulbosa* (antes *P. decipiens* C), cuya presencia en el fletán negro y foca barbuda (*Erignathus barbatus*) del Atlántico Noroeste ya ha sido indicada con anterioridad empleando técnicas moleculares (Mattiucci y Nascetti, 2008). En este caso, sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que las pocas larvas detectadas en este trabajo pertenezcan a *P. decipiens* (s.s.), que también ha sido encontrada en *R. hippoglossoides* y otros hospedadores paraténicos y definitivos en estas aguas (McClelland, 2002; Mattiucci y Nascetti, 2008). Esta última, sin embargo, suele parasitar la musculatura de sus hospedadores, mientras *P. bulbosa* parece restringirse a la cavidad visceral, y más concretamente, a la superficie del hígado de los peces (McClelland, 2002), tal y como se observó en este estudio. Finalmente, tres especies de la subfamilia Contracaecinae denominadas *C. osculatum* A y B y *P. cystophorae*, todas ellas parásitas de pinnípedos, han sido identificadas en hospedadores de la costa atlántica canadiense (Mattiucci y Nascetti, 2008). Es por ello que en este caso es imposible sugerir una posible identidad para las larvas de este tipo detectadas en este estudio.

La comparación entre nuestros resultados y los obtenidos por otros autores resulta bastante difícil por varias razones. En primer lugar, en ninguno de los estudios que se han publicado sobre la presencia de anisákidos en fletán negro capturado en la costa atlántica canadiense se incluyó el área de la Div. 3L entre las zonas de muestreo (Arthur and Albert, 1993; Arthur and Albert, 1994; Boje *et al.*, 1997). La zona de captura más próxima estudiada fue en la Div. 3K de NAFO (Boje *et al.*, 1997), localizada inmediatamente al

norte de la Div. 3L, donde se registró una prevalencia global de *Anisakis* del 26%, con una intensidad media inferior a 1,8. A primera vista, uno podría pensar, en base a nuestros resultados, que la parasitación del fletán negro en NAFO se ha incrementado sensiblemente durante los últimos años. Sin embargo, los estudios previos citados anteriormente demuestran que la parasitación por anisákidos puede variar considerablemente de una zona a otra debido, entre otros factores, a posibles diferencias en: 1) las condiciones climatológicas y oceanográficas de la zona, 2) la abundancia relativa de los mamíferos marinos que actúan como hospedadores definitivos y reservorios de estos nematodos, y 3) la disponibilidad de hospedadores intermediarios y paraténicos que sirven como presas y fuente de infección para el fletán negro. Como es lógico, además, estos factores pueden ser muy variables en el tiempo, de ahí que para poder analizar de forma fiable la evolución temporal de la parasitación por anisákidos en éste, y en cualquier otro hospedador, tendría que llevarse a cabo un programa de monitorización plurianual en las mismas zonas y realizando los muestreos en la misma época del año.

Los datos de prevalencia y abundancia media presentados en este trabajo demuestran que *R. hippoglossoides* presenta una elevada parasitación muscular “natural” por *Anisakis*. Esto significa que gran parte de las larvas L3 que ingiere el pez y que acceden a la cavidad visceral del mismo, son capaces de atravesar la membrana peritoneal e invadir la musculatura hipoaxial circundante. Estos resultados son muy interesantes ya que en ninguno de los trabajos previos en los que se analizó la parasitación muscular de esta especie se especificaron los datos concretos de la misma ni su evolución a lo largo de la vida del pez (Arthur and Albert, 1993, 1994; Boje *et al.*, 1997). En concreto, la información obtenida por estos autores fue utilizada únicamente para calcular los datos de parasitación global (visceral + muscular) pues el objetivo principal de estas investigaciones era encontrar especies parásitas que pudieran ser utilizadas como bioindicadores de stocks poblacionales de este pleuronéctido.

A diferencia de lo observado en el caso de *Anisakis*, no se detectaron larvas musculares de *P. decipiens* (*s.l.*), si bien la prevalencia de éstas en el fletán negro de la Div. 3L fue muy baja. Este hallazgo, no obstante, podría estar relacionado con la genoespecie a la que pertenecen las larvas halladas en los hospedadores capturados en esta zona. Así, de las dos especies del complejo *P. decipiens* (*s.l.*) que han sido detectadas en el Atlántico Noroeste, *P. decipiens* (*s.s.*) parece tener preferencia por la musculatura de sus

hospedadores, mientras las larvas de *P. bulbosa* parecen preferir la superficie del hígado para encapsularse (McClelland, 2002).

En cuanto a la ausencia de larvas de *Contracaecum/Phocascaris* en la musculatura, debemos resaltar que la distribución habitual de este tipo de nematodos suele restringirse a la cavidad corporal (Køie and Fagerholm, 1995), donde se suelen asentar en los mesenterios, tal y como hemos observado en este trabajo. Esta preferencia de microhábitat explicaría la escasez de casos de contracecosis humana descritos hasta la fecha (Audicana *et al.*, 2003; Shamsi y Butcher, 2011).

Hoy en día se sabe que la proporción relativa de larvas de *Anisakis* presentes en cavidad visceral y musculatura varía según la especie hospedadora y que, en general, las larvas de *Anisakis* suelen encapsularse en mayor proporción sobre la superficie de las vísceras y en los mesenterios (Smith y Wootten, 1978; Karl *et al.*, 2011). Lo que no está claro es qué factores determinan que unas especies acumulen mayor cantidad de larvas en su musculatura que otras. Algunos autores como Young (1972) han postulado que el grado de parasitación muscular de un pez podría estar relacionado con una distancia migratoria óptima de las larvas. Así, según esta hipótesis, las larvas que acceden a la cavidad visceral del pez efectuarían una breve migración antes de encapsularse definitivamente en los tejidos del hospedador. De esta manera, si la distancia entre el punto de acceso de las larvas a la cavidad y la musculatura circundante es pequeña y se encuentra dentro de esta distancia migratoria óptima, la invasión muscular podría producirse con mayor probabilidad que cuando el trayecto entre ambos puntos supera dicha distancia. Esta hipótesis, por tanto, implicaría que la probabilidad de infección muscular debería ser inversamente proporcional a las dimensiones del pez. Así, en peces grandes, la distancia entre el punto de salida de las larvas del tracto intestinal y la musculatura sería lo suficientemente grande como para permitir que el parásito se encapsulara sobre las vísceras antes de alcanzar las ijadas. En los últimos años, esta hipótesis ha sido cuestionada y algunos autores han sugerido que las diferencias en la composición bioquímica de los posibles microhábitats del parásito en el pez podrían ser importantes a la hora de explicar el grado de parasitación muscular exhibido por las distintas especies (Strømmes y Andersen, 1998). Desde esta perspectiva, se ha sugerido que el mayor contenido graso de la musculatura podría ser un factor favorable para el asentamiento de las larvas en estos tejidos periviscerales, de ahí que el alto contenido graso de la musculatura de *R. hippoglossoides* (Krzynowek y Murphy, 1987; Torry Research Station, 1989) podría

explicar la elevada parasitación observada en este trabajo. Al margen de esta idea, debemos subrayar también que la inversión progresiva en la proporción relativa de larvas musculares y viscerales observada en las 5 clases de talla analizadas en este estudio indica que la parasitación muscular parece ocurrir con mayor frecuencia en el fletán negro de menor tamaño. Esto explicaría también la evolución de la abundancia media observada en las ijadas de las distintas clases de talla, que, en contraposición a la parasitación visceral, parece descender cuando los individuos superan los 46 cm de longitud. Estos hallazgos, en cierto modo, estarían sugiriendo que en este hospedador las larvas también se distribuyen en el pez atendiendo a una distancia migratoria óptima según la cual existiría una mayor probabilidad de invasión muscular en los individuos de menor talla. Otra posible explicación, perfectamente compatible con la anterior, podría ser que en los ejemplares de mayor tamaño las larvas tuvieran mayor dificultad para atravesar la membrana peritoneal que separa el paquete visceral de las ijadas.

La elevada parasitación muscular del fletán negro observada en este trabajo es especialmente relevante desde la perspectiva sanitaria ya que las larvas de *Anisakis* presentes en este hospedador pertenecen, con toda probabilidad, a la especie *A. simplex* (s.s.) que, como se ha dicho antes, está considerada el principal agente causal de la anisakidosis humana. Este aspecto, como es lógico, tiene trascendencia para el sector pesquero y alimentario y debería ser tenido en cuenta por los responsables de empresas alimentarias y consumidores que vayan a producir, comercializar y/o consumir productos de esta especie crudos o procesados por procedimientos, como el ahumado en frío, que se no se consideran efectivos a la hora de inactivar las larvas presentes en el pescado. En este sentido, las empresas dedicadas a la producción de este tipo de ahumados, muy abundantes en Dinamarca, deberían asegurarse de incluir en su diagrama de flujo un paso de congelación previo como punto de control crítico orientado a garantizar la muerte de este parásito y la inocuidad alimentaria del producto final. Otras posibles medidas de control aplicables en este caso incluirían evitar el uso de las ijadas para el consumo o para la producción de ahumados en frío o, en el caso de filetes sin piel, el examen al trasluz (*candling*) de los mismos, que permitiría retirar del mercado aquellas piezas más parasitadas y extraer las larvas contenidas en las menos parasitadas. Respecto al descarte de las ijadas debemos resaltar que, aunque las larvas musculares de *Anisakis* y *Pseudoterranova* suelen concentrarse mayoritariamente en las ijadas, existen hospedadores

en los que se ha registrado también parasitación en lomos y colas (Karl *et al.*, 2011). Desafortunadamente, este aspecto no fue evaluado en este estudio pero merece atención para futuras investigaciones pues tiene gran importancia desde la perspectiva alimentaria.

Finalmente, nuestros datos revelan, tal y como se ha comprobado en otras especies de peces, que la carga parasitaria global de *Anisakis* aumenta con el tamaño del hospedador, aspecto que sin duda está relacionado con el carácter acumulativo de la infección y con la longevidad de las larvas encapsuladas, que hace que éstas se mantengan viables de manera indefinida en el hospedador. Además, los individuos de mayor edad tienden a comer más y a seleccionar presas de mayor tamaño que incluyen peces y cefalópodos (Tabla 2), que sirven de hospedadores paraténicos para las larvas L3 de este nematodo. La posición de estas presas en la cadena trófica hace que estén más parasitadas que el zooplancton, que es consumido en mayor medida por las tallas inferiores. Estos cambios ontogénicos en la dieta, por tanto, suponen un incremento progresivo de la tasa de reclutamiento del parásito.

CRUSTACEOS	PECES
Gammaridea	<i>Serrivomer beani</i>
Hyperiidea	Paralepididae
<i>Gennadas sp</i>	Gadiformes
<i>Lebbeus polaris</i>	Macrouridae
Natantia	<i>Coryphaenoides rupestris</i>
<i>Acanthephyra sp</i>	<i>Macrourus berglax</i>
<i>Pandalus borealis</i>	<i>Nezumia bairdii</i>
<i>Pandalus sp</i>	<i>Antimora rostrata</i>
<i>Pasiphaea tarda</i>	<i>Benthosema glaciale</i>
<i>Sergestes arcticus</i>	<i>Lampanictus sp</i>
Euphausiacea	Myctophidae
<i>Gnatophausia sp</i>	<i>Notoscopelus elongatus</i>
Mysidacea	<i>Mallotus villosus</i>
MOLUSCOS	Otros peces
Decapoda Cefalopoda	<i>Ammodytes dubbius</i>
Oegopsida	Scombridae
OTROS	<i>Hippoglossoides platessoides</i>
No identificado	Liparidae
Procesado fletan	<i>Cyclothone microdon</i>
VARIOS	
Scyphozoa	
Teutorium	

**Tabla 2.** Relación de presas obtenida del análisis de contenidos estomacales realizado durante la campaña “Fletan Negro 3L 2012” (datos cedidos por el Instituto Español de Oceanografía de Vigo).



## CONCLUSIONES

1. En la Div, 3L de NAFO, zona en donde la pesquería de fletán negro (*Reinhardtius hippoglossoides*) realiza el mayor esfuerzo y obtiene sus máximos rendimientos, esta especie está abundantemente parasitada por anisákidos de interés sanitario. Desde esta perspectiva, es especialmente importante la elevada parasitación muscular registrada en el caso de las larvas de *Anisakis*, que son consideradas las principales causantes de anisakidosis humana en todo el mundo.
2. La elevada prevalencia de parasitación observada en las ijadas de los individuos recién capturados indica que en este hospedador las larvas de *Anisakis* son capaces de migrar de forma natural de la cavidad a la musculatura tras su ingestión. Este aspecto debería ser tenido en cuenta por los operadores alimentarios que comercialicen fletán negro fresco, susceptible de ser consumido crudo o insuficientemente cocinado, o sometido a procesos de transformación como el ahumado en frío, que no se consideran efectivos para inactivar los anisákidos presentes en la musculatura del pescado.
3. El análisis de la carga parasitaria observada en las distintas clases de talla examinadas sugiere, sin embargo, que en el fletán negro la tasa de infección muscular por larvas de *Anisakis* se ve reducida una vez se superan los 46 cm de longitud.
4. La ausencia de clases de talla comerciales de fletán negro libres de parasitación muscular hace que, al menos en el área de estudio, la captura selectiva de determinadas tallas no se pueda considerar una medida de control efectiva para reducir el riesgo asociado a la presencia de larvas de *Anisakis* en la carne de esta especie comercial.

## REFERENCIAS

- Albert, O. T., Nilssen, E. M., Stene, A., Gundersen, A. y Nedreaas, K. H. (1998).** Spawning of the Barents Sea/Norwegian Sea Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*). ICES Council Meeting 1998/O:22.
- Akira, N. (2004).** Greenland halibut (the Okhotsk open sea, *Reinhardtius hippoglossoides*) Kokusai Gyogyo Shigen no Genkyo Heisei 15 Nendo. 378-381.
- Arthur, J. R. y Albert, E. (1993).** Use of parasites for separating stocks of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) in the Canadian Northwest Atlantic. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, **50**: 2175-2181.
- Arthur, J. R. y Albert, E. (1994).** A survey of the parasites of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) caught off Atlantic Canada, with notes on their zoogeography in this fish. Canadian Journal of Zoology, **72**: 765-778.
- Audicana, M. T., del Pozo, M. D., Iglesias, R. y Ubeira, F. M. (2003).** *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens*. Chapter 38. En: International handbook of foodborne pathogens. (Miliotis, M. D. y Bier, J. W., Eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, pp: 613-636.
- Berland, B. (2006).** Musing on nematode parasites. Fisker og Havet, 11. Havforskningsinstituttet, Bergen, 26 pp.
- Boje, J., Riget, F. y Køie, M. (1997).** Helminth parasites as biological tags in population studies of Greenland Halibut (*Reinhardtius hippoglossoides* (Walbaum)), in the North-West Atlantic. ICES Journal of Marine Science, **54**: 886-895.
- Bowering, W. R. y Chumakov, A. K.. (1989).** Distribution and relative abundance of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides* (Walbaum)) in Canadian northwest Atlantic from Davis Strait to the northern Grand Bank. Fisheries Research, **7**: 301-327.
- Bowering, W. R. y Nedreaas, K. H. (2000).** A comparison of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides* (Walbaum)) fisheries and distribution in the Northwest and Northeast Atlantic. Sarsia **85**: 61-76.

- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M. y Shostak, A. W. (1997).** Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *Journal of Parasitology*, **83**: 575-583.
- Chiperzak, D. B., Saurette, F. y Raddi, P. (1995).** First record of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) in the Beaufort Sea (Arctic Ocean). *Artic*, **48**(4), 368-371.
- Daschner, A., Cuellar, C. y Rodero, M. (2012).** The *Anisakis* allergy debate: does an evolutionary approach help?. *Trends in Parasitology*. **28**: 9-15.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2010).** Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal*, **8**(4):1543, 91pp.
- Godo, O. R. y Haug, T. (1989).** A review of the natural history, fisheries, and management of Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) in the Eastern Norwegian and Barents Seas. *Journal ICES* **46**: 62-75.
- Iglesias, R. (1998).** La anisakiosis y su diagnóstico. Tesis doctoral. (Ubeira, F. M., Ed.), Imprenta Universitaria, Santiago de Compostela, 144 pp.
- Iglesias, R. y Ubeira, F. M. (2007).** Riesgos y medidas preventivas en relación con el consumo de pescado parasitado por *Anisakis*. *Alimentaria*, **389**: 62-68.
- Karl, H., Baumann, F., Ostermeyer, U., Kuhn, T. y Klimpel, S. (2011).** *Anisakis simplex* (s.s.) larvae in wild Alaska salmon: no indication of post-mortem migration from viscera into flesh. *Diseases of Aquatic Organisms*, **94**: 201-209.
- Køie, M. y Fagerholm, H. P. (1995).** The life cycle of *Contraccaecum osculatum* (Rudolphi, 1802) sensu stricto (Nematoda, Ascaroidea, Anisakidae) in view of experimental infections. *Parasitology Research*, **81**: 481-489.
- Krzynowek, J. y Murphy, J. (1987).** Proximate composition, energy, fatty acid, sodium, and cholesterol content of finfish, shellfish and their products. NOAA Technical Report NMFS 55, U. S. Department of Commerce, 53 pp.

- Mattiucci, S. y Nascetti, G. (2008).** Advances and trends in the molecular systematics of anisakid nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite co-evolutionary processes. *Advances in Parasitology*, **66**: 47-148.
- Mattiucci S., Paoletti M., Webb S. C., Sardella N., Timi J. T., Berland B. y Nascetti G. (2008).** Genetic relationships among species of *Contracaecum* Railliet and Henry, 1912 and *Phocascaris* Höst, 1932 (Nematoda: Anisakidae) from pinnipeds inferred from mitochondrial *cox2* sequences, and congruence with allozyme data. *Parasite*, **15**: 408-419.
- McClelland, G. (2002).** The trouble with sealworms (*Pseudoterranova decipiens* species complex, Nematoda): a review. *Parasitology*, **124**: S183-S203.
- Moukhametov, I. N., Orlov, A. M. y Leaman, B. M. (2008).** Diet of Pacific halibut (*Hippoglossus stenolepis*) in the northwestern Pacific Ocean. International Pacific Halibut Commission. Technical Report No. 52 ISSN: 0074-7246.
- Román, E., Armesto, A. y González-Troncoso, D. (2012).** Results for the Spanish Survey in the NAFO Regulatory Area of Division 3L for the period 2003-2011. NAFO Sci. Coun. Res. Doc. 006 Serial No. N6030, 33 p.
- Shamsi, S. y Butcher, A. (2011).** First report of human anisakidosis in Australia. *Medical Journal of Australia*, **194**: 199-200.
- Smith, J. W. y Wootten, R. (1978).** *Anisakis* and Anisakiasis. *Advances in Parasitology*, **16**: 93-163.
- Strømnes, E. y Andersen, K. (1998).** Distribution of whaleworm (*Anisakis simplex*, Nematoda, Ascaridoidea) L3 larvae in three species of marine fish; saithe (*Pollachius virens* (L.)), cod (*Gadus morhua* L.) and redfish (*Sebastes marinus* (L.)) from Norwegian waters. *Parasitology Research*, **84**: 281-285.
- Scott, W.B. y Scott, M. G. (1988).** Atlantic fishes of Canada. *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* **19**:731 p.
- Torry Research Station. (1989).** Yield and nutritional value of the commercially more important fish species. *FAO Fisheries Technical Paper* N° 309. FAO, Roma. 187 pp.

- Van Thiel, P. H., Kuipers, F. C. y Roskam, R. T. (1960).** A nematode parasitic to herring, causing acute abdominal syndromes in man. *Trop Geogr Med*, **12**: 97-113.
- Yang, M. S. y Livingston, P. A. (1988).** Food habits and daily ration of Greenland halibut, *Reinhardtius Hippoglossoides*, in the eastern Bering Sea. *Fish. Bull.*, 86:675-690.
- Young, P. 1972.** The relationship between the presence of larval anisakine nematodes in cod and marine mammals in British home waters. *Journal of Applied Ecology*, **9**: 459-485.